Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Haffner

Zur Wirkung von Zellgiften auf Trypsin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizin, Chirurgie und Geburtshilfe

Einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Karl Konrad Maier
aus Tailfingen in Württemberg

1944

Berichterstatter: Professor Dr. Haffner
Dekan: Professor Dr. Engelhardt

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Zur Wirkung von Zellgiften auf Trypsin

Die zahlreichen Untersuchungen, die bereits über die Wirkung chemischer Mittel auf Fermente gemacht worden sind, hatten, soweit sie von pharmakologischen Gesichtspunkten aus unternommen wurden, im allgemeinen den Zweck, den Wirkungsmechanismus chemischer Einwirkungen auf das Lebendige durch eine Beeinflussung der Fermentvorgänge zu erklären oder wenigstens die Beteiligung von Fermentbeeinflussungen am Wirkungsbild festzustellen. Die folgende Untersuchung benützte demgegenüber das Ferment als Versuchsobjekt, zunächst lediglich in der Absicht, eine verschiedenartige Wirkungsweise verschiedener Stoffgruppen an einem einfachen Modell nachzuweisen.

Als solche Stoffgruppen verschiedener Art wurden untersucht:

1. Chemisch indifferente, lipoidlösliche Narcotica,
2. Phenol,
3. Formaldehyd,
4. Oxydationsmittel,
5. Reduktionsmittel,
6. Schwermetallsalze,
7. andere eiweißfällende Stoffe,
8. einige weitere Antiseptica.

Als Testobjekt diente handelsübliches Trypsin und Pancreasdispert, deren tryptische Wirkung auf Gelatine verfolgt wurde. Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur im Reagenzglas durchgeführt und der tryptische Effekt in einfacher Weise durch Titration mittels Natronlauge gegen Phenolphthalein bestimmt. Da zu erwarten war, daß bei einem Teil der untersuchten Stoffe eine Bindung an Gelatine erfolgt und dadurch ihre wirksame Konzentration gegenüber Trypsin herabgesetzt wird, wurden zwei Versuchsreihen angesetzt. In der ersten wurde zu dem fertigen Fermentansatz mit seinem endgültigen Gehalt an Trypsin und Gelatine die zu untersuchende Substanzlösung zugegeben und nach entsprechender Zeit durch Titration die Veränderung der fermentativen Wirkung im Vergleich zu einem Kontrollansatz ohne Zugabe bestimmt. In der zweiten Versuchsreihe wurde zunächst die Fermentlösung mit Substanzlösung eine Stunde lang zusammengebracht und darauf erst durch Zusatz von

Gelatinelösung die Fermentierung in Gang gebracht und dann weiterhin wie im ersten Ansatz verfahren.

Untersuchungsverfahren im einzelnen

a) Gelatinelösung:

Benützt wurde eine 10prozentige Gelatinelösung in destilliertem Wasser, die mit n/10 NaOH leicht alkalisch gemacht wurde bis zur Grenze des Phenolphthaleinumschlages, also rund 8,0 ph. Um 5 ccm einer 10prozentigen Gelatinelösung zu alkalisieren, waren 1,3 ccm n/10 NaOH nötig. Beim Einfüllen in die Reagenzgläser hatte die Gelatinelösung eine Temperatur unter 40 ° C.

b) Trypsinlösung:

Verwendet wurde eine 1prozentige Lösung von handelsüblichem Trypsin in destilliertem Wasser.

c) Pancreasdispertlösung:

Zur Verwendung kam eine 1prozentige Lösung von Pancreasdispert in destilliertem Wasser.

d) Substanz:

Zur Feststellung des Wirkungsgrades der Substanzen wurden diese in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt.

Wie schon erwähnt, wurden immer zwei Versuchsreihen angesetzt:

1.) Versuchsanordnung der 1. Reihe:

1 ccm Trypsinlösung (bzw. Pancreasdispertlösung),
2 ccm Gelatinelösung,
1 ccm der zu untersuchenden Substanz in verschiedenen Konzentrationen

werden gemischt und sofort titriert mittels n/10 NaOH gegen Phenolphthalein. Nach 24 Stunden wird eine parallele Versuchsreihe titriert.

2.) Versuchsanordnung der 2. Reihe:

1 ccm des zu untersuchenden Stoffes und 1 ccm Trypsinlösung wurde eine Stunde lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Daraufhin Zusatz von 2 ccm Gelatinelösung. Sofortige Titration und Titration einer parallelen Versuchsreihe nach 24 Stunden.

e) Kontrollansatz:

Zu jeder Versuchsreihe wurde gleichzeitig eine Kontrolle mit angesetzt, bestehend aus
1 ccm Trypsinlösung (bzw. Pancreasdispertlösung) und
2 ccm Gelatinelösung.
Diese wurde ebenfalls sofort und ihr Parallelversuch nach 24 Stunden titriert.

Versuchsergebnisse

1. Verhalten der Kontrolle

Eine nach der soeben geschilderten Methode angesetzte Kontrollösung hat, sofort nach Mischung titriert, einen Verbrauch von 0,1 ccm n/10 NaOH bis zur Rosafärbung des Phenolphthaleins. Nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur ergab sich ein Verbrauch von 0,45—0,5 n/10 NaOH. Dabei war der Ansatz flüssig geblieben. Dieselbe Gelatinelösung ohne Trypsin war im Gegensatz dazu fest geworden und zeigte nach 24 Stunden keinen Mehrverbrauch von NaOH.

2. Einwirkung von Wärme auf Gelatine und Trypsinlösung

Kochte man Gelatinelösung im Wasserbad 10 Minuten lang und setzte ihr nach Abkühlung Trypsinlösung zu, so waren, um eine Rosafärbung zu erhalten, bei sofortiger Titration und bei Titration nach 24 Stunden die gleichen Mengen n/10 NaOH wie im obigen Versuch nötig. Wurden aber Trypsin- und Gelatinelösung zu gleicher Zeit im Wasserbad gekocht, so ergab sich bei der Titration nach 24 Stunden, daß die eiweißspaltende Wirkung von Trypsin, wie zu erwarten war, vollständig aufgehoben war.

3. Bei **Anwesenheit der von uns untersuchten chemischen Stoffe** ergaben sich, abhängig von der Konzentration, alle Grade von Hemmungswirkung, von den Ansätzen an, bei denen das Ergebnis von dem der Kontrolle nicht deutlich unterschieden war, bis zur völligen Unterdrückung der Fermenttätigkeit. In letzterem Falle hatte der Ansatz dieselbe gelatinöse Beschaffenheit wie die unfermentierte Gelatine, zum Teil waren auch durch die Substanzen Fällungserscheinungen oder Verfärbungen aufgetreten.

Die Versuchsergebnisse, die sich durchweg auf wiederholte Untersuchungen stützen, sind im folgenden tabellarisch wiedergegeben. Die Tabelle beschränkt sich auf die wirksamen Grenzkonzentrationen.

Zeichenerklärung

xxxx	100prozentige	Unterdrückung	der	Fermenttätigkeit	
xxx	75	"	"	"	"
xx	50	"	"	"	"
x	25	"	"	"	"
KU	Keine		"	"	"

Die obere Zahlenreihe bedeutet die Konzentration der chemischen Stoffe in Prozenten.

Die Ergebnisse der Versuchsanordnung der 2. Reihe, in der die Einwirkung der Substanz auf das Ferment zunächst ohne Anwesenheit von Gelatine geschehen war, stehen in der oberen, die der 1. Versuchsreihe in der unteren Zeile.

Zu den Angaben der 2. Versuchsreihe ist noch zu bemerken, daß die Ergebnisse unter der Konzentration notiert sind, die bei der Einwirkung der Substanz auf Trypsin (bzw. Pancreasdispert) ohne Gelatineanwesenheit herrschte, also während der 1. Stunde des Versuchs. Infolge des darauf geschehenen Gelatinezusatzes wurde die Substanzkonzentration für die weitere Einwirkungszeit (23 Stunden) auf die Hälfte herabgesetzt.

Außer der Angabe der Konzentration und ihrer Wirksamkeit sind in der Tabelle auch noch die im jeweiligen Versuch verbrauchten Mengen NaOH in ccm n/10 aufgeführt. Dabei bedeutet die Zahl vor dem Strich den Verbrauch zu Beginn des Versuchs, die Zahl nach dem Strich den Verbrauch nach 24 Stunden Fermentierung, die Differenz somit den Effekt der Trypsinwirkung (bzw. Pancreasdispertwirkung). In den Kontrollversuchen mit handelsüblichem Trypsin ohne Giftzusatz lag der Anfangswert bei 0,1, der Schlußwert bei 0,5, die ungehemmte Trypsinwirkung entsprach somit 0,4. In den Versuchen mit Pancreasdispert als Ferment war der Anfangswert der Kontrolle bei 0,15, der Schlußwert bei 0,8, die ungehemmte Pancreasdispertwirkung entsprach somit 0,65.

Tabelle der Versuchsergebnisse

A. Versuche mit Trypsin

Alkohol	50%	25%				
	0,1—0,5 KU					
		0,1—0,5 KU				
Chloralhydrat	12%	6%				
	0,4—1,1 KU					
		0,4—1,1 KU				
Urethan	10%	5%				
	0,1—0,4 x					
		0,1—0,4 x				
Phenol	2%	1%				
	0,1—0,5 KU					
		0,1—0,5 KU				
Zephirol	2,5%	1,25%				
	0,1—0,8 KU					
		0,1—0,8 KU				
Formalin	1 : 8	1 : 10	1 : 20	1 : 40		
	0,2—0,2 gelatin. x x x x	0,6—0,8 x x	0,45—0,8 (x)	0,3—0,7 KU		
	1 : 4 KU					
Chloramin	1,25%	0,75%	0,5%	0,375%	0,25%	0,125%
	gelatinös x x x x	gelatinös x x x x	0,1—0,1 flüssig x x x x	0,1—0,2 x x x	0,1—0,3 x x	0,1—0,5 KU
	0,1—0,5 KU					
Jodjodkali	n/20	n/40	n/80	n/100	n/150	
	1,0—1,1 Blau x x x	0,2—0,3 x x x	0,2—0,3 x x x	0,2—0,5 x	0,2—0,6 KU	
	KU					

Sublimat	1,25 %	0,625 %	0,25 %	0,125 %	0,1 %	0,05 %
	1,7—1,7 x x x x	0,9—0,9 x x x x	0,4—0,6 x x	0,2—0,4 x x	0,2—0,5 x	0,2—0,6 KU
	3,2—3,3 x x x	KU	KU			
Natrium-metabisulfit	1 %	0,5 %	0,25 %	0,1 %	0,05 %	0,025 %
	2,0—2,0 x x x x	1,0—1,1 x x x	0,5—0,6 x x x	0,25—0,4 x x	0,2—0,4 x x	0,1—0,4 (x) KU
Natrium-hydrosulfurosum	1,5 %	1 %	0,5 %	0,375 %	0,25 %	
	gelatinös x x x x	1,4—1,5 x x x	0,8—1,0 x x	0,5—0,7 x x	0,2—0,6 KU	
Natrium-fluorid	2,5 %	2 %	1,5 %	1 %	0,5 %	0,375 %
	0,4—0,5 x x x	0,3—0,5 x x	0,3—0,5 x x	0,2—0,5 x	0,15—0,5 (x)	0,1—0,5 KU
Sulfosalicyl-säure	0,5 %	0,25 %	0,125 %	0,05 %	0,025 %	
	0,8—0,8 Fällung x x x x	0,4—0,45 Fällung x x x	0,2—0,3 Fällung x x x	0,0—0,2 Fällung x x		
	1,5—1,6 Fällung x x x	0,8—0,9 Fällung x x x	0,4—0,6 Fällung x x	0,2—0,5 Fällung x	0,1—0,5 KU	
Borsäure	1,5 %	1 %	0,5 %	0,25 %	0,1 %	0,05 %
	0,9—0,9 x x x x	0,5—0,6 x x x	0,3—0,4 x x x	0,15—0,4 x (x)	0,2—0,5 x	0,1—0,5 KU
	0,75 %	0,45—0,7 x x		0,2—0,4 x x	0,1—0,5 KU	
	0,8 - 0,9 x x x					
Perhydrol	15 %	12,5 %	10 %	7,5—5 %	2,5—0,5 %	
	0,35—0,35 x x x x	0,25 - 0,3 x x x (x)	0,25—0,4 x x (x)	0,2 - 0,4 x x	0,1—0,4 (x) KU	
				0,2—0,9 KU		
Tannin	5 %	3,75 %	2,5 %	1,25 %	0,5 %	0,25 %
	0,5—0,5 x x x x	0,3—0,5 x x	0,3—0,5 x x	0,2—0,5 x	0,1—0,5 KU	
			0,3—0,5 x x	0,3—0,5 x x	0,2—0,5 x	0,1—0,5 KU
Kalziumchlorid	5 %	3,75 %	2,5 %	1,25 %		
	0,1—0,35 x	0,1—0,4 KU				
			0,1—0,45 x	0,1—0,5 KU		

B. Versuche mit Pancreasdispert

Chinon	0,25 %	0,125 %	0,06 %			
	0,3—1,2 KU	0,3—1,2 KU	0,3—1,2 KU			
		0,3 1,2 KU				
Borsäure	1 %	0,5 %	0,25 %	0,125 %	0,06 %	
	0,8—1,1 x x	0,4—0,8 x x	0,3—0,8 x	0,2—0,8 KU		
		0,8—1,2 x x	0,4—0,8 x x	0,3—0,8 x	0,2—0,8 KU	
Jodjodkali	n/20	n/40	n/80	n/160	n/320	
	1,1—1,1 x x x x	0,6—0,8 x x x	0,4—0,8 x x	0,2—0,8 KU		
		0,6—0,8 x x x	0,6—0,8 x x x	0,4—0,7 x x	0,2—0,8 KU	
Phenol	2 %	1 %	0,5 %			
	0,3—0,9 x	0,2—0,8 KU				
		0,3—0,9 x	0,2—0,8 KU			
Eisenchlorid	0,5 %	0,25 %	0,125 %	0,05 %	0,25 %	
	gelatinös x x x x	0,8—1,0 x x (x)	0,4—0,8 x x	0,3—0,8 x	0,2—0,9 KU	
	gelatinös x x x x	1,4—1,6 x x (x)	0,7—1,1 x x	0,4—1,0 (x)	0,3—1,0 KU	

Zusammenfassung

1. Wirkungsstärke gegenüber Trypsin:

Auffallend wenig, beziehungsweise keine Wirkung hatten:

Narcotica
Phenol
Zephirol
Perhydrol
Chinon.

Deutliche Hemmung der Trypsinwirkung machten:

Formaldehyd
Tannin
Fluornatrium.

Starke Hemmung der Trypsinwirkung machten:

Chloramin
Jodjodkali
Sublimat
Eisenchlorid
Natriumbisulfat, Natriumhydrosulfurosum
Borsäure, Sulfosalicylsäure.

Bei den Salzen der schwefligen Säure, Borsäure und Eisenchlorid, muß die Frage offenbleiben, ob die Hemmung durch die Substanz oder die begleitende Säurereaktion bedingt ist.

2. Hemmung der schädigenden Wirkung auf Trypsin durch Eiweiß (Gelatine):

Keine oder unbedeutende Hemmung durch Eiweiß ergab sich bei:

Narcotica
Phenol
Sulfosalicylsäure
Borsäure
Tannin
Eisenchlorid;

deutliche bei:

Perhydrol;

starke bei:

Formaldehyd
Tannin
Sublimat.

Bei Jodjodkali ist die Frage noch ungeklärt.

3. Im Gegensatz zur Wirksamkeit der untersuchten Stoffe gegenüber Zellen zeigen sich somit gegen Trypsin im allgemeinen nur Stoffe hochwirksam, die das Eiweiß grob angreifen.

Lebenslauf

Am 30. April 1921 wurde ich, Karl Konrad Maier, als Sohn des Abteilungsleiters Hermann Maier und seiner Ehefrau Emilie geborene Maute in Tailfingen in Württemberg geboren.

Nach Besuch der Mittelschule in Tailfingen und der Oberschule in Ebingen legte ich 1939 die Reifeprüfung ab.

Nun meldete ich mich freiwillig zum Reichsarbeitsdienst und wurde ein halbes Jahr beim Bau des Westwalles eingesetzt. Im Herbsttrimester 1939 begann ich das Studium der Medizin an der Universität in Erlangen. Während den Trimestern des Jahres 1940 studierte ich in Tübingen, wo ich im Januar 1941 die ärztliche Vorprüfung ablegte.

Wenige Tage später wurde ich zur Wehrmacht einberufen. In einem Artillerieregiment des Heeres nahm ich im Sommer und Herbst 1941 an den Kämpfen im Mittelabschnitt der Ostfront teil, wurde dann zu einer Sanitätseinheit versetzt, mit der ich in den Norden der Ostfront zog. Von dort kehrte ich im Dezember 1942 zum dienstlichen Studium nach Tübingen zurück. Hier werde ich die übrigen Semester bis zum Staatsexamen 1945 verbringen.

Druck der Buchdruckerei Lauk, Altensteig